

# 东部白松 SRAP 反应体系的建立和优化

王 骞 春, 冯 建, 陆 爱 君, 于 世 河, 曲 艺, 董 建

(辽宁省林业科学研究所 辽宁 沈阳 110032)

**摘 要:**以东部白松针叶 DNA 为模板, 采取正交实验设计  $L_{16}(4^5)$  对 SRAP-PCR 反应体系的 5 个因素 ( $Taq$  酶,  $Mg^{2+}$ , dNTPs, 模板 DNA, 引物) 在 4 个水平上进行优化试验。结果表明: 确定东部白松 SRAP-PCR 最佳反应体系 (20  $\mu$ L):  $Taq$  酶 0.5 U,  $Mg^{2+}$  1.5 mmol/L, dNTPs 0.15 mmol/L, 模板 DNA 50 ng, 引物 0.1  $\mu$ mol/L。

**关键词:** 东部白松; SRAP-PCR; 体系优化

**中图分类号:** S 791.243 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)21-0168-04

SRAP 标记 (Sequence-Related Amplified Polymorphism) 是由 Li 等在 2001 年提出的一种基于 PCR 的分子标记技术<sup>[1]</sup>。SRAP 技术的基本原理是通过 1 对引物对 ORFs 进行扩增, 分为正向引物 (F-primer) 和反向引物 (R-primer)。正向引物长 17 bp, 5' 端的前 10 bp 是一段填充序列, 无任何特异组成, 接着是 CCGG 序列, 这 14 bp 组成核心序列, 随后为 3' 端的选择性碱基, 正向引物对外显子进行扩增。反向引物的组成与正向引物类似, 区别在于反向引物长 18 bp, 填充序列为 11 bp, 接着是特异序列 AATT, 它们组成核心序列, 3' 端仍然为 3 个选择性碱基, 反向引物对内含子区域和启动子区域进行扩增。因内含子、启动子和间隔序列在不同物种甚至不同个体间变异很大, 从而与正向引物搭配扩增出基于内含子和外显子的 SRAP 多态性标记<sup>[2]</sup>。该方法具高共显、中产率、多态性高和重复性好的特点, 已被广泛应用于遗传多样性分析<sup>[3]</sup>、遗传图谱构建和基因定位<sup>[4]</sup>、基因分离<sup>[5]</sup>、品种鉴定<sup>[6]</sup> 等研究工作。近年来这项技术在各种林木资源中已被广泛运用, 但对东部白松树种的研究还未见报道。东部白松 (*Pinus strobus*) 又称北美乔松, 为北美东部最有价值树种之一。该树种具有商用价值高、观赏性强、抗污染性强等优良特性, 为北美重要绿化树种。辽宁省引种的东部白松生长显著优于当地主要造林树种红松<sup>[7]</sup>。现通过正交实验设计  $L_{16}(4^5)$  首次确立了适合于东部白松 SRAP-PCR 分析的反应体系, 该体系很好的满足了东部白松 SRAP 扩增要求, 为东部白松的

不同种源地区间遗传多样性、遗传图谱的建立提供技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

DNA 样本采自辽宁省试验林场苗圃 4 a 生白松, 于 2009 年 7 月采当年生新发针叶, 液氮冻存后放 -80℃ 冰箱保存备用。CTAB-free 处理液: 0.2 mol/L Tris-HCl (pH 8.0), 0.25 mol/L NaCl, 0.05 mol/L EDTA ; 4×CTAB; Tris-HCl (pH 8.0) 0.1 mol/L, NaCl 1.5 mol/L, EDTA 0.05 mol/L, PVP 2%, CTAB 4%,  $\beta$ -巯基乙醇 4% ( $\beta$ -巯基乙醇用前加入); 10×PCR buffer、 $MgCl_2$ 、 $Taq$  酶和 dNTPs 购自天根生化科技 (北京) 有限公司, SRAP 引物购自上海生工生物工程技术有限公司。

### 1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取方法 (CTAB-free 法) 取洗净的针叶, 用灭菌剪刀剪成小段置 1.5 mL 离心管中 (约至 0.1 刻度线)。加适量 PVP 和 VC, 向离心管中加入液氮后用塑料研磨杵将针叶研磨成粉末, 加入 1 mL 0℃ 预冷的 CTAB-free 提取液, 混匀, 0℃ 冰浴 10 min, 期间轻柔颠倒 2~3 次, 10 000 r/min 离心 10 min, 弃上清。若上清液黏稠, 用 CTAB-free 提取液清洗; 加入 650  $\mu$ L 65℃ 预热的 4×CTAB 提取液, 用无菌枪头小心将其混匀, 65℃ 水浴 30 min; 加入等体积的氯仿 : 异戊醇 (V : V) = 24 : 1 的抽提液, 轻柔颠倒离心管 10 min, 使其混匀, 10 000 r/min 离心 10 min; 用去尖枪头小心吸取 450  $\mu$ L 上清液至另一离心管中, 重复第 4 步 1~2 次, 至白色中间层消失为止; 加入 2 倍体积的冰冷无水乙醇, 颠倒混匀, 出现絮状沉淀, -20℃ 放置 2 h。10 000 r/min 离心 10 min, 弃上清; 70% 乙醇清洗 2 遍, 干燥, 溶于 100  $\mu$ L 灭菌双蒸水。

1.2.2 基因组 DNA 的检测和定量 提取的总 DNA 用

第一作者简介: 王骞春 (1979-), 男, 硕士, 现在主要从事林木遗传育种方向工作。E-mail: ginkgo.wang@163.com。

基金项目: “十一·五” 国家林业局“948” 资助项目 (2006-4-62); 辽宁省科学技术计划重大资助项目 (2008207001)。

收稿日期: 2010-08-13

0.8%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量。将总 DNA 稀释 200 倍,用 UV1102 型紫外分光光度计检测其在 260 nm 和 280 nm 的吸光值,OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>在 1.8~2.0 之间表示 DNA 的纯度较高。根据 260 nm 波长下,每 1 mL 中 1 μg DNA 钠盐溶液的 OD 值为 0.02,即在 OD<sub>260</sub>=1.0 时双链 DNA 浓度为 50 μg/μL,可估算 DNA 浓度(μg/L)=OD<sub>260</sub>×N(DNA 稀释倍数)×50/1000。

1.2.3 正交实验设计 PCR 采用 20 μL 体系,确定反应中 5 个因素(Taq 酶、dNTPs、Mg<sup>2+</sup>、模板 DNA、引物)的最佳水平,在 4 个水平上进行试验(表 1),采用正交设计利用正交表 L<sub>16</sub>(4<sup>5</sup>),获得 16 个处理(表 2),2 次重复。

1.2.4 SRAP-PCR 扩增 扩增程序:94℃预变性 5 min;94℃变性 1 min,35℃复性 1 min,72℃延伸 1 min,5 个循环;94℃变性 1 min,50℃复性 1 min,72℃延伸 1 min,40 个循环,最后 72℃延伸 10 min,4℃保存。正向引物,反向引物选择公布的标准 SRAP 引物(表 2)中的 ME5-EM2 组合,SRAP-PCR 产物检测 2.0% 琼脂糖凝胶上电泳,然后用紫外凝胶成像系统观察、拍照。

表 1 SRAP-PCR 体系的因素水平

水平	因素				
	1	2	3	4	5
	模板	Mg <sup>2+</sup>	dNTPs	引物	Taq 酶
/ng·(20μL) <sup>-1</sup> /mmol·L <sup>-1</sup> /mmol·L <sup>-1</sup> /μmol·L <sup>-1</sup> /U·(20μL) <sup>-1</sup>					
1	37.5	1.0	0.05	0.1	0.5
2	50	1.5	0.1	0.2	1.0
3	75	2.0	0.15	0.3	1.5
4	150	2.5	0.2	0.4	2.0

表 2 SRAP-PCR 反应引物

正向引物	反向引物
ME1: 5'TGAGTCCAAACCGGATA-3'	EM1: 5'GACTGCGTACGAATTAAT-3'
ME2: 5'TGAGTCCAAACCGGAGG-3'	EM2: 5'GACTGCGTACGAATTTGC-3'
ME3: 5'TGAGTCCAAACCGGAAT-3'	EM3: 5'GACTGCGTACGAATTGAC-3'
ME4: 5'TGAGTCCAAACCGGACC-3'	EM4: 5'GACTGCGTACGAATTTGA-3'
ME5: 5'TGAGTCCAAACCGGAAG-3'	EM5: 5'GACTGCGTACGAATTAAAC-3'
ME6: 5'TGAGTCCAAACCGGTAA-3'	EM6: 5'GACTGCGTACGAATTGCA-3'
ME7: 5'TGAGTCCAAACCGGTCC-3'	EM7: 5'GACTGCGTACGAATTCAA-3'
ME8: 5'TGAGTCCAAACCGGTGC-3'	EM8: 5'GACTGCGTACGAATTCTG-3'
	EM9: 5'GACTGCGTACGAATTGCA-3'
	EM10: 5'GACTGCGTACGAATTTCAG-3'
	EM11: 5'GACTGCGTACGAATTCCA-3'

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 结果分析

提取的总 DNA 用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测(图 1)。用紫外分光光度计检测其在 OD<sub>260</sub>nm 为 0.015,OD<sub>280</sub>nm=0.008,OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>=1.875。根据公式可得出 DNA 的浓度为:0.015×200×50/1000=0.15 μg/L。

2.2 SRAP-PCR 反应体系的确定

2.2.1 PCR 电泳结果评分 按照表 2 设计处理,选择引物对 ME5-EM2 进行 PCR 反应,电泳检测结果如图 2,检

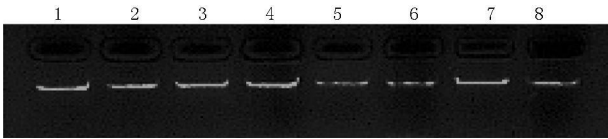


图 1 DNA 琼脂糖电泳结果

表 3 SRAP-PCR 反应因素水平 L<sub>16</sub>(4<sup>5</sup>) 正交实验设计

编号	模板	Mg <sup>2+</sup>	dNTPs	引物	Taq 酶
/ng·(20μL) <sup>-1</sup> /mmol·L <sup>-1</sup> /mmol·L <sup>-1</sup> /μmol·L <sup>-1</sup> /U·(20μL) <sup>-1</sup>					
1	37.5	1.0	0.05	0.1	0.5
2	37.5	1.5	0.1	0.2	1.0
3	37.5	2.0	0.15	0.3	1.5
4	37.5	2.5	0.2	0.4	2.0
5	50	1.0	0.1	0.3	2.0
6	50	1.5	0.05	0.4	1.5
7	50	2.0	0.2	0.1	1.0
8	50	2.5	0.15	0.2	0.5
9	75	1.0	0.15	0.4	1.0
10	75	1.5	0.2	0.3	0.5
11	75	2.0	0.05	0.2	2.0
12	75	2.5	0.1	0.1	1.5
13	150	1.0	0.2	0.2	1.5
14	150	1.5	0.15	0.1	2.0
15	150	2.0	0.1	0.4	0.5
16	150	2.5	0.05	0.3	1.0

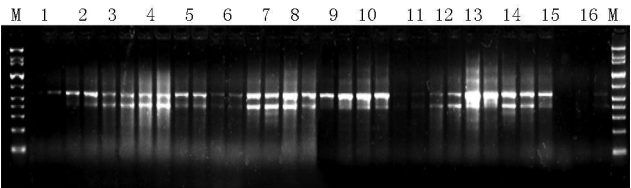


图 2 PCR 产物电泳结果

注 M: 1kb plus DNA Ladder (10 000、8 000、5 000、2 000、1 600、700、500、400、300、200 bp)。

测结果显示,2 次重复结果一致性较好,可以用于评分比较统计分析。评分时根据条带多少、清晰度及背景颜色进行打分,条带丰富,清晰度高,背景颜色浅的记 16 分,相反最差记 1 分<sup>[8]</sup>。对 2 次重复分别单独进行统计得分,2 次重复试验分别独立统计,依处理次序得到的 2 次分数分别记为:1、6、10、8、11、8、16、15、5、12、4、12、11、16、14、1;2、7、10、8、11、8、16、14、11、12、4、12、11、15、1、2。按表 2 求各列各水平的和 T<sub>1</sub>、T<sub>2</sub>、T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub>;因为各水平 4 次重复,由和求出各水平平均值  $\overline{T_1}$ 、 $\overline{T_2}$ 、 $\overline{T_3}$ 、 $\overline{T_4}$ ;用各列最大平均值减去最小平均值各列的极差 R(表 4)。R 越大说明该因素对指标影响越大。各因素水平变化对 PCR 反应的影响从大到小依次为:dNTPs,模板,引物 Mg<sup>2+</sup>,Taq 酶。

2.2.2 dNTPs 浓度分析 dNTPs 浓度过高易产生错误碱基的掺入,浓度过低则降低反应产量,dNTP 可与 Mg<sup>2+</sup>

表 4 SRAP-PCR 各因素统计

因素 统计值	模板	Mg <sup>2+</sup>	dNTPs	引物	Taq
T1	26	31.5	15	45	35.5
T2	49.5	42	37	36	32
T3	36	37.5	48	34.5	41
T4	35.5	36	47	31.5	38.5
T1	6.5	7.9	3.8	11.3	8.9
T2	12.4	10.5	9.3	9	8
T3	9	9.4	12	8.6	10.3
T4	8.9	9	11.8	7.9	9.5
R	5.9	2.6	8.2	3.4	2.3

结合,使游离的 Mg<sup>2+</sup> 浓度下降,影响 DNA 聚合酶的活性。从图 3 可知,dNTPs 浓度对试验结果的影响最明显,特别是当 dNTPs 浓度过低时,导致无扩增产物或扩增条带很模糊。结果均值在 dNTPs 浓度为 0.05 ~ 0.2 mmol/L 时,呈现先升后降趋势,dNTPs 浓度为 0.15 mmol/L 时结果均值最高,与 0.05 mmol/L 差异显著,与 0.2 mmol/L 时差异不大,所以选择浓度 0.15 mmol/L 为最佳水平。

2.2.3 Mg<sup>2+</sup> 浓度分析 Mg<sup>2+</sup> 浓度过低会使 Taq 酶活性丧失,PCR 产量下降;Mg<sup>2+</sup> 过高反应特异性降低,出

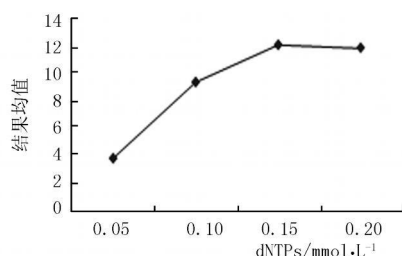


图 3 dNTPs 浓度与结果均值关系

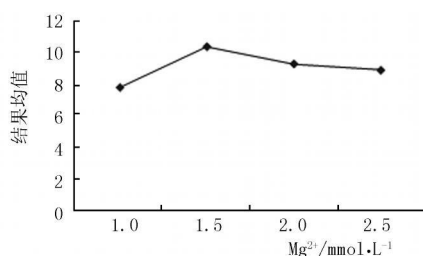
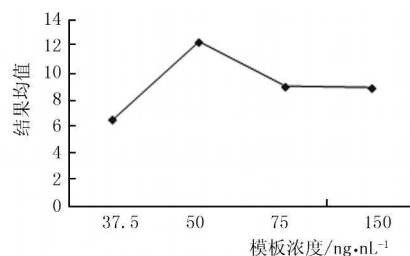
图 4 Mg<sup>2+</sup> 浓度与结果均值关系

图 5 模板浓度与结果均值关系

2.2.5 引物浓度分析 引物浓度过高易导致模板与引物错配,反应非特异性扩增,且可增加引物之间形成二聚体的机会。一般 PCR 反应中引物的终浓度为 0.2 ~ 1 μmol/L,在此范围内,PCR 产物量基本相同。但引物低于 0.2 μmol/L 时,则产物量降低。引物浓度过高会促进引物的错误引导非特异产物合成,还会增加引物二聚体的形成。非特异产物和引物二聚体也是 PCR 反应的底物,与靶序列竞争 DNA 聚合酶,dNTPs 底物,从而使靶序列的扩增量降低。但该试验中,引物的最低浓度为 0.1 mol/L,结果均值以此时为最大,电泳图 2 中显示当引物浓度为 0.1 μmol/L 时,产物量没有降低。随着引物浓度递增至 0.4 μmol/L,结果均值一直呈现下降趋势,所以选择 0.1 μmol/L 为最佳反应水平(图 6)。

2.2.6 Taq 酶浓度分析 酶量过高可引起反应非特异性扩增,酶量过少则合成产物量减少。在该试验中 Taq 酶的水平从 0.5 ~ 2 U 的范围内,结果均值差异最小,从 0.5 ~ 1 U 范围内呈略下降趋势,1 ~ 1.5 U 又呈渐渐增长趋势,随后到 2.0 U 时又稍稍下降,总体差异不大,出

现非特异扩增。Mg<sup>2+</sup> 可与负离子结合,所以反应体系中 dNTP、EDTA 等的浓度影响反应中游离的 Mg<sup>2+</sup> 浓度。由图 4 可知,Mg<sup>2+</sup> 浓度在 1 ~ 1.5 mmol/L 范围内时随着浓度水平增加,结果均值也增加,到 1.5 mmol/L 达最大,但差异不显著。在 1.5 ~ 2.5 mmol/L 范围内,结果均值递减。但从图 2 电泳结果却看不出条带效果优劣与 Mg<sup>2+</sup> 浓度评分结果关联性。因此推测结果均值同其它反应因素综合作用有关。经典 PCR 反应中, Mg<sup>2+</sup> 浓度在 1.5 ~ 2.0 mmol/L 之间。因此考虑到综合因素,确定最佳反应水平为 1.5 mmol/L。

2.2.4 模板浓度分析 模板浓度为最低水平时,主要表现为产物丰度低,浓度过高,则可能使引物或 dNTPs 过早耗尽,底物过量扩增,过早进入线性阶段,出现扩增结果不稳定的假象。从图 2 的电泳效果可知,当模板浓度为最低水平时,主要表现为条带不够丰富,浓度过高反应结果不稳定。由图 5 可知,模板浓度在 37.5 ng/20 μL 时结果均值最低,50 ng/20 μL 时最高,50 ~ 150 ng/20 μL 呈下降趋势。所以选择模板浓度 50 ng/20 μL 为最佳水平。

于经济考虑,选则 0.5 U 为最佳水平(图 7)。

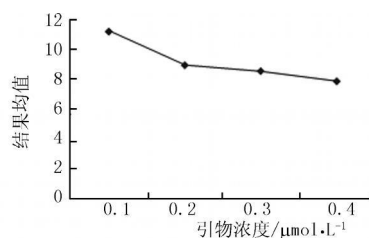


图 6 引物浓度与结果均值关系

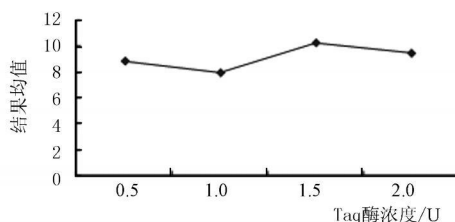


图 7 Taq 酶浓度与结果均值关系

2.2.7 优化体系的验证 根据以上结果分析, 东部白松 SRAP-PCR 优化反应体系(20  $\mu$ L)反应体系中各因子终浓度)为: *Taq* 酶 0.5 U,  $Mg^{2+}$  1.5 mmol/L, dNTPs 0.15 mmol/L, 模板 DNA 50 ng, 引物 0.1  $\mu$ mol/L。使用优化反应体系验证, 结果表明此反应体系可以获得较好的结果(图 8)。

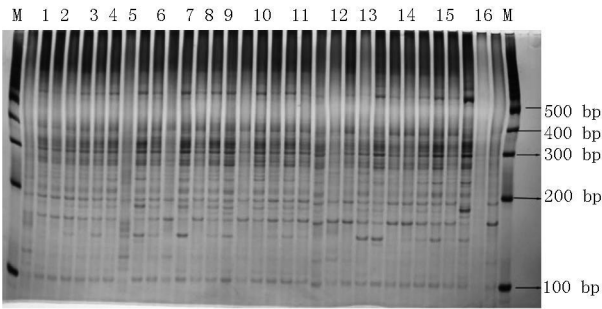


图 8 优化体系 PCR 电泳结果

注 M: 100 bp Ladder DNA Maker (1 500, 1 000, 700, 500, 400, 300, 200, 100 bp)

3 结论与讨论

SRAP 标记技术是一种基于 PCR 反应的分子标记技术, 所以标记的关键在于建立起最优的 SRAP-PCR 体系。该试验结果表明, 不同体系组合对试验结果有很大影响。通过正交实验设计  $L_{16}(4^5)$ , 电泳结果评分统计分析, 得出以下结论: 东部白松 SRAP-PCR 反应体系最佳条件为: 20  $\mu$ L 中, *Taq* 酶 0.5 U,  $Mg^{2+}$  1.5 mmol/L, dNTPs 0.15 mmol/L, 模板 DNA 50 ng, 引物 0.1  $\mu$ mol/L; 试验中各因素对 PCR 反应的影响从大到小依次为: dNTPs 模板, 引物,  $Mg^{2+}$ , *Taq* 酶; 东部白松 DNA 的 SRAP-PCR 有较宽的退火适应温度范围, 在 55 ~ 46  $^{\circ}$ C 范围内 PCR 反应结果较一致, 无明显差异。

通过试验发现, 高质量的基因组 DNA 是保证扩增效果佳、重复性好的关键条件。东部白松和其它松科植

物相似, 都含有大量影响高质量 DNA 分离的次生物质如多酚、多糖和单宁等。常规方法分离出的 DNA 由于多酚而被氧化成棕褐色, 多糖、单宁等物质与 DNA 会结合成黏稠的胶状物, 影响 DNA 纯度<sup>[9]</sup>。该试验采用 CTAB-free 法提取东部白松基因组 DNA, CTAB-free 处理液对针叶组织匀浆洗涤后再进行 DNA 提取, 可去除大部分多糖等次生代谢物质对提取的干扰, 4 $\times$  CTAB 抽提和固体 PVP、VC 和  $\beta$ -巯基乙醇防止氧化作用的干扰, 得到的 DNA 质量较高, 很好的满足了下一步的 PCR 试验分析。

PCR 反应中体系各因素是互相作用的, 进而影响 PCR 反应结果, 试验采用正交实验设计, 试验中各因素间、因素内水平间的相关性分析结果采用统计方法, 结合电泳图及各图表, 使分析结果比较科学完善直观, 最终反应的电泳结果中, 条带丰富, 清晰, 稳定, 说明试验设计符合要求, 结果满足东部白松 SRAP-PCR 反应要求。

参考文献

[ 1 ] Li G, Quirios C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction; its application to mapping and gene tagging in Brassica [ J ]. TheorAppl Genet, 2001, 103 ( 8 ): 455-461.

[ 2 ] 张安世, 刑智峰, 刘永英, 等. SRAP 分子标记及其应用 [ J ]. 安徽农业科学, 2007, 35 ( 9 ): 2562-2563.

[ 3 ] 刘艳萍, 郭志富, 刘玉东, 等. 利用 SRAP 标记分析新疆地区主要杨属树种的遗传多样性 [ J ]. 植物生理学通讯, 2008, 44 ( 2 ): 225-228.

[ 4 ] 王刚, 潘俊松, 李效尊, 等. 黄瓜 SRAP 遗传连锁图的构建及侧枝基因定位 [ J ]. 中国科学: C 辑( 生命科学 ), 2004, 34 ( 6 ): 510-516.

[ 5 ] 卢泳全, 吴为人. 应用 SRAP 技术从大米草根中分离盐胁迫应答基因 [ J ]. 浙江大学学报( 农业与生命科学版 ), 2006, 32 ( 5 ): 511-14.

[ 6 ] 於朝广, 殷云龙, 徐建华. 用 SRAP 标记鉴定落羽杉属植物杂种 [ J ]. 林业科学, 2009, 45 ( 2 ): 142-146.

[ 7 ] 尤文忠, 陆爱君, 牟光辉, 等. 东部白松种源引进苗期选择研究 [ J ]. 辽宁林业科技, 2005 ( 2 ): 1-4.

[ 8 ] 刘运生, 陈立华, 曹美鸿, 等. 正交设计直观分析法优化 PCR 条件 [ J ]. 湖南医科大学学报, 1998, 23 ( 4 ): 403-404.

[ 9 ] 魏志刚, 王艳敏, 杨传平. 松科植物基因组总 DNA 提取方法的比较 [ J ]. 生物技术通讯, 2007, 18 ( 2 ): 263-266.

Establishment and Optimization of SRAP Reaction System in *Pinus strobus*

WANG Qian-chun, FENG Jian, LU Ai-jun, YU Shi-he, QU Yi, DONG Jian  
(Liaoning Academy of Forestry Science, Shenyang, Liaoning 110032)

**Abstract:** To construct the optimum SRAP reaction system of *Pinus strobus*, *Pinus strobus* needles DNA was abstracted as template and orthogonal experimental design  $L_{16}(4^5)$  was used. And the comprehensive effect of four levels of five factors (*Taq* polymerase,  $Mg^{2+}$ , dNTPs, DNA template and primer) was assessed., The results showed that an optimal and stable SRAP-PCR system for *Pinus Strobus* was obtained: 0.5 U *Taq* polymerase, 1.5 mmol/L  $Mg^{2+}$ , 0.15 mmol/L dNTPs, 50 ng DNA template, 0.1  $\mu$ mol/L primer, within total 20  $\mu$ L reaction solution.

**Key words:** *Pinus strobus*; SRAP-PCR; system optimization